

<p>95-127357/17 B04 D16 SHKJ 93.06.11 SHINGIJUTSU JIGYODAN *JP 07051073-A 93.06.11 93JP-140806 (95.02.28) C12N 15/09, A61K 39/395, C07K 14/00, C12P 21/02, C12N 1/21 // A61K 38/00, G01N 33/53 (C12N 1/21, C12R 1:19) (C12P 21/02, C12R 1:19) Ras protein guanine nucleotide exchange factor C3G gene - useful for diagnosis and treatment of malignant tumours associated with ras oncogene activation C95-058229 Addnl. Data: 94.06.13 94JP-130699</p>	<p>B(4-E3, 4-F10A3E, 4-G1, 4-N3E, 11-C8E5, 12-K4A1, 12-K4F, 14-H1B) D(5-H11A1, 5-H12A, 5-H12E, 5-H14A1, 5-H17A6) .7</p>
<p>The cDNA of C3G protein gene which is ras protein guanine nucleotide exchange factor is new.</p> <p>Also claimed are:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>(1) a cloning vector contg. the above cDNA,</li> <li>(2) an expression vector contg. the above cDNA,</li> <li>(3) a transformant of <i>E.coli</i> carrying the above expression vector,</li> <li>(4) C3G protein produced by the above transformant and</li> <li>(5) an anti-C3G protein antibody prepd. by using the above C3G protein as the antigen.</li> </ol>	<p><u>USE</u> Using the new gene, protein, etc. a new diagnostic method and a new method for treating malignant tumours associated with activation of the ras gene can be developed.</p> <p><u>EXAMPLE</u> cDNA synthesised from mRNA of C3G protein gene isolated from human spleen was inserted into <math>\lambda</math>gt11 and the recombinant phage were used to infect <i>E.coli</i> Y1090 and applied on a LA agar medium. A nitrocellulose film contg. 1mM IPTG was applied on it after 6 hrs., and cultured for 3 hrs., and then the film was reacted with a phosphate buffer contg. 2% skimmed milk and 0.05% Tween 20 for 1 hr. Then, it was reacted with a phosphate buffer contg. 1 <math>\mu</math>g/ml GST-CRKM and 1 <math>\mu</math>g/ml anti-GST monoclonal antibody for 1 hr., and with a phosphate buffer contg. 1 <math>\mu</math>g/ml alkali phosphatase-labelled anti-mouse antibody for 1 hr. The phage combining with CRK protein was identified by using AP Purple. The phage was plaque- purified (3 rounds) and the DNA</p> <p>JP 07051073-A+</p>

was prepd. by phenol extraction. The DNA was cleaved by EcoRI and electrophoresed to prepare a fragment of cDNA of human C3G protein. The partial cDNA was labelled and used to screen the above human spleen cDNA recombinant  $\lambda$ gt11 library by plaque hybridisation.

The clone  $\lambda$ gt121 was isolated having 6 types of C3G protein cDNA. It was purified and subcloned to phagemid vector pUC118. A single-stranded DNA was purified from the resultant recombinant vector and its base sequence was determined. It was confirmed to be a new ras protein guanine nucleotide exchange factor. (GS1). (9pp031DwgNo.0/1)

JP 07051073-A

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-51073

(43) 公開日 平成7年(1995)2月28日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A			
A 6 1 K 39/395		D 9284-4C		
C 0 7 K 14/00		8318-4H		
		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
		8314-4C	A 6 1 K 37/ 02	A D U
審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 9 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平6-130699

(22) 出願日 平成6年(1994)6月13日

(31) 優先権主張番号 特願平5-140806

(32) 優先日 平5(1993)6月11日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 390014535

新技術事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 松田 道行

東京都世田谷区桜丘4-6-11

(72) 発明者 倉田 毅

東京都府中市府中2-7-3-605

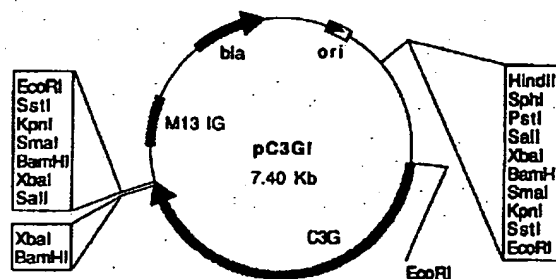
(74) 代理人 弁理士 西澤 利夫

(54) 【発明の名称】 C 3 G 蛋白遺伝子の c D N A

(57) 【要約】

【構成】 r a s 蛋白グアニンヌクレオチド交換因子であるC 3 G 蛋白遺伝子の c D N A、この c D N A を含有するクローニングベクターおよび発現ベクター、この発現ベクターを保有する形質転換体、この形質転換体により生産されるC 3 G 蛋白、および抗C 3 G 蛋白抗体。

【効果】 r a s 群遺伝子の活性化に伴う悪性腫瘍の新たな診断方法や治療方法の開発が可能となる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 ras 蛋白グアニンヌクレオチド交換因子であるC3G蛋白遺伝子のcDNA。

【請求項2】 配列番号1の塩基配列をコードする請求項1のcDNA。

【請求項3】 請求項1または2のcDNAを含有するクローニングベクター。

【請求項4】 クローニングベクターが、E. coli C3G1 (FERMP-13651) の保有するプラスミドpC3G1である請求項3のクローニングベクター。

【請求項5】 請求項1または2のcDNAを含有する発現ベクター。

【請求項6】 cDNAが、請求項3または4のクローニングベクターより調製されたDNA断片である請求項5の発現ベクター。

【請求項7】 請求項5または6の発現ベクターを保有する大腸菌の形質転換体。

【請求項8】 請求項7の形質転換体により生産されるC3G蛋白。

【請求項9】 配列番号2のアミノ酸配列を有する請求項8のC3G蛋白。

【請求項10】 請求項8または9のC3G蛋白を抗原として調製した抗C3G蛋白抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、ras 蛋白グアニンヌクレオチド交換因子であるC3G蛋白遺伝子のcDNAと、このcDNAを含む組換えベクター、この組換えベクターを保有する形質転換体、形質転換体により生産されるC3G蛋白、およびそのC3G蛋白を抗原として調製した抗C3G蛋白抗体に関するものである。この発明のcDNA、その発現産物であるC3G蛋白および抗C3G蛋白抗体は、癌遺伝子rasの活性化により生じる悪性腫瘍の診断、基礎研究および新たな癌治療方法の開発等に極めて有用である。

【0002】

【従来の技術とその課題】 近年の遺伝子工学技術の進歩には目覚ましいものがあり、発癌のメカニズム等についても遺伝子レベルでの研究が活発に行なわれ、ヒトの発癌に関係する多数の癌遺伝子や癌抑制遺伝子が明らかになってきている。そのような癌遺伝子の一種として、レトロウイルス（マウス肉腫ウイルス）より見いだされたras 群遺伝子が知られており、このras 群遺伝子の発現する蛋白（以下、ras 蛋白と記載する）は、高等真核動物細胞の増殖に関与する蛋白の主たるものの一つであり、ヒトの膵臓癌や大腸癌を始めとする多くの悪性腫瘍部位で活性化していることが明らかになっている。

【0003】 さらにこのras 蛋白は、ras 蛋白グアニンヌクレオチド交換因子によって活性化されることも

明らかになっている。このため、ras 蛋白グアニンヌクレオチド交換因子は、ras 群遺伝子の活性化に伴う悪性腫瘍の診断指標として、また各種抗癌剤によるミサイル療法等の標的としてその重要性が関心を集めている。

【0004】 従来、高等動物におけるras 蛋白グアニンヌクレオチド交換因子としては、mCDC25、mSOSおよびGDSという3種類の蛋白が知られていたが、この発明の発明者等は、ras 蛋白と他の癌遺伝子発現産物との関係を広く研究する過程で、上記3種類の蛋白とは異なった新しいras 蛋白グアニンヌクレオチド交換因子が存在することを見出し、この蛋白の分離精製にも成功して、これをC3G蛋白と命名した。

【0005】 この発明は、従って、上記のC3G蛋白を、たとえば癌の診断や発癌メカニズムの解明、あるいは新たな癌療法の開発等に広く有効利用するために為されたものであり、このC3G蛋白遺伝子のcDNAと、このcDNAの簡便な操作および蛋白の多量発現を可能とする遺伝子工学材料を提供することを目的としている。

【0006】 さらにこの発明は、上記cDNAの発現産物であるC3G蛋白と、C3G蛋白に対する抗体を提供することを目的としてもいる。

【0007】

【課題を解決するための手段】 この発明は、上記の課題を解決するものとして、ras 蛋白グアニンヌクレオチド交換因子であるC3G蛋白遺伝子のcDNAを提供する。またこの発明は、上記cDNAを含有するクローニングベクターおよび発現ベクター、並びにこの発現ベクターを保有する大腸菌の形質転換体を提供する。

【0008】 さらにこの発明は、上記形質転換体により生産されるC3G蛋白と、この蛋白を抗原として調製した抗C3G蛋白抗体をも提供する。以下、この発明について詳しく説明する。

【0009】 ras 蛋白グアニンヌクレオチド交換因子であるC3G蛋白の遺伝情報を担うcDNAは、例えば、ヒト、マウス、ニワトリ等の高等真核動物細胞から、例えばSambrookらの方法（Molecular Cloning Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989）に従って単離精製することができる。すなわち、動物細胞のゲノムDNAからC3G蛋白遺伝子のmRNAを精製し、次いでこのmRNAから逆転写酵素を用いてcDNA鎖を合成すればよい。このようにして合成することのできるC3G蛋白のcDNAのうち、ヒト細胞由来のcDNAの塩基配列およびその翻訳領域のアミノ酸配列を配列表の配列番号1および2にそれぞれに示した。

【0010】 次に、この発明のクローニングベクターは、上記方法により得たcDNAの断片を、公知のクローニング用ベクターに挿入結合することによって作成す

ることができる。cDNA断片とベクターの結合は、例えば上記Sambrookらの方法に従えばよい。なお、使用するベクターとしては、大腸菌を宿主とするベクタープラスミドまたはラムダファージが好ましく、ベクタープラスミドとしては、pUC118、pUC119またはpBR322由来のもの等を用いることができる。またラムダファージを用いる場合にはラムダgt11が好適なものとして例示できる。

【0011】さらに、上記cDNAを組み込んだクローニングベクターの選択も公知の方法（例えば上記Sambrookら）に従って行なうことができ、たとえば、ベクターとしてラムダファージ由来のラムダgt11を用いた場合の組換え体の選択は、次のように行なうことができる。すなわち、この発明の上記cDNAを結合した組換えラムダgt11を37℃の温度条件下で、大腸菌Y1090に感染させ、トリプトン、イーストエキストラクト、NaCl、アンピシリン、寒天を含む培地（以下LA寒天培地と略する）に培養する。次に、イソプロピルチオ-D-ガラクトシド（以下IPTGと略する）を含むニトロセルロースあるいはナイロン膜を乗せ、さらに数時間培養して、感染した大腸菌を膜に転写する。この膜と酵素標識したCRK蛋白（Matsuda et al., Mol. Cell, Biol. 12: 3482-3489, 1992）を反応させた後、酵素に対する基質を入れることで、C3G蛋白のcDNAを組み込んだクローニングベクターを有する大腸菌株を選択することができる。酵素標識としてはアルカリフォスファターゼあるいはペルオキシダーゼが好適に用いられる。またCRK蛋白をグルタチオンSトランスフェラーゼ（以下GSTと略する）との融合蛋白として製造し、このGSTに対する抗体を用いて選択することも可能である。

【0012】この発明では、下記実施例に示した通り、ベクタープラスミドpUC118に、配列番号1の塩基配列をコードするcDNAを結合して、組換えベクターpC3GIを実際に作成し、さらにこれを大腸菌K12株由来のXLI-Blue株に導入してE. coli C3GIを作成し、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託して受託番号FERM P-13651を得た。

【0013】この発明の発現ベクターは、C3G蛋白遺伝子のcDNAを公知の遺伝子発現ベクターに組み込むことにより作成することができる。cDNAは、動物細胞のmRNAから合成したものでもよいが、より好ましくは、この発明の上記クローニングベクターから調製して用いることができる。また、遺伝子発現用ベクターとしては、特に制限はないが、好ましくは大腸菌を宿主とするpGEX1、pGEX2TまたはpGEX3X等を用いるようにする。

【0014】以上のようにして作成したこの発明の発現ベクターを公知の方法により大腸菌に導入することによりこの発明の形質転換菌を作成することができ、さらに

この形質転換体を公知の方法によって培養することにより、この発明のC3G蛋白を容易かつ大量に製造することができる。その具体例を示せば、たとえば次のとおりである。すなわち、形質転換大腸菌をアンピシリン含有LBプロスをを用い37℃で3～24時間培養し、集菌した菌体を超音波破碎またはトリトンX-100とリゾチームにより溶菌し、この試料を担体に接着させることにより目的とするC3G蛋白を分離精製することができる。

【0015】さらに、このようにして精製したC3G蛋白を常法に従って動物に接種することにより、C3G蛋白に対する抗体を得ることができる。動物としては、たとえばウサギ、マウス、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ハムスター等を用いることができるが、ウサギまたはマウスが特に好ましい。このようにして得た抗C3G蛋白抗体は、たとえば試料中のC3G蛋白の定量や分離に用いることができ、その結果、ras群遺伝子の活性化の程度を測定すること（すなわち、癌の診断）が可能となる。

【0016】また、この発明のcDNA、蛋白および抗体は、新たな癌療法の開発に有用な各種の遺伝子操作材料を提供する。すなわち、C3G蛋白遺伝子のアンチセンスRNAやC3Gの変異タンパク、あるいはこれらのRNA、変異タンパクまたは抗C3G蛋白抗体を癌細胞中で発現させるウィルスベクター等である。以下、実施例を示してこの発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。

【0017】

#### 【実施例】

##### 実施例1

（ヒトC3G蛋白遺伝子のcDNAの単離）ヒト脾臓から単離したC3G蛋白遺伝子のmRNAより合成したcDNAをラムダgt11に組み込み、この組換え体で大腸菌Y1090に感染させ、LA寒天培地に塗布した。6時間後この培地上に1mM IPTGを含むニトロセルロース膜を乗せ、さらに3時間培養した後、このニトロセルロース膜を2%スキムミルク、0.05%Tween 20を含むリン酸緩衝液（pH7.5）と1時間反応させた。ついで、1μg/ml GST-CRK、1μg/ml 抗GSTモノクローナル抗体を含むリン酸緩衝液と1時間、1μg/ml アルカリフォスファターゼ標識抗マウス抗体（TAGO社製品）と1時間反応させた後、アルカリフォスファターゼの基質であるAPパープル（Bio101社製品）を用いてCRK蛋白と結合するファージを同定した。このファージを3回のブランク形成を行って純化したのち、そのDNAをフェノール抽出法により調製し、制限酵素EcoRIで切断後、電気泳動することによりヒト由来C3G蛋白のcDNAの一部分を調製した。ついでこのcDNA部分をランダムオリゴプライマー（ペーリンガー社製品）と<sup>32</sup>pデオキシシチジン三リン酸とをもちいてアイソトープ標

識し、標識DNAを用いてSambrookらの方法 (Molecular Cloning Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989) により、先に述べたヒト脾臓由来のcDNA組換えラムダgt11をブランクハイブリダイゼーションによりスクリーニングし、さらに6種類のC3G蛋白cDNAを有する組換えラムダgt11を得た。これらのファージのDNAを制限酵素EcoRIで切断し、C3G蛋白のcDNAを精製してファージミドベクターpUC118にサブクロニングした。得られた組換えベクターより1本鎖DNAを精製し、その塩基配列を自動核酸配列読み取り機 (ファルマシア社製品) を用いて決定した。その塩基配列を配列表の配列番号1に、また予想される翻訳領域のアミノ酸配列を同じく配列番号2に示す。このアミノ酸配列をヨーロッパ分子生物学研究所 (EMBL)、ジーンバンク (GenBank) に登録されているデータベースで検索したところ、C3G蛋白のカルボキシル末端側は酵母のCDC25を始めとして、ras蛋白のグアニンヌクレオチド交換因子群と30%以上同一であったが、既知の高等動物ras蛋白グアニンヌクレオチド交換因子群とは異なるもので、新しいras蛋白グアニンヌクレオチド交換因子であることを確認した。

#### 実施例2

(クローニングベクターと形質転換菌の作成) 実施例1で、C3G蛋白のcDNAをサブクロニングするのに用いたpUC118の組換え体群から、各々重複する部分を除いた断片を切り出し、それらを結合して7.4kbからなるクローニングベクターpCG3Iを作成した。このpCG3Iの構成は図1に示した通りである。

【0018】さらにこのクローニングベクターpCG3Iを、大腸菌K12株由来のXL1-Blue株に導入し、形質転換菌E. coli C3GIを得た。

#### 実施例3

(C3G蛋白の製造) 実施例2で得たクローニングベクターpCG3IをEcoRIで切断し、C3G蛋白のcDNA領域を調製して、これを発現プラスミドpGEX1に組み込んだ。この発現ベクターを大腸菌DH5に導入して形質転換菌を作成し、この形質転換菌を、1リットルのアンピシリン含有L-ブローズ中で、吸光度が

0.6になるまで培養した後、IPTGを0.5mMになるように加え、さらに3時間培養を続けた。次いで、菌体を集菌した後、超音波処理し、菌体破砕物を除いた上清をグルタチオンセファロース (ファルマシア社製品) と混ぜ、グルタチオンセファロースをリン酸緩衝液で洗浄した後、5mMのグルタチオンを含むリン酸緩衝液でC3G蛋白を遊離させた。この蛋白をリン酸緩衝液で透析した後、一部をSDS-ポリアクリルアミドゲルにて分析した結果、純度90%以上のGST融合蛋白が合成されていた。

#### 実施例4

(抗C3G蛋白抗体の作成) 実施例3で精製したC3G蛋白を、完全フロイントアジュバントとともに家兎に2週間おきに3回皮下接種したのち、その血清を採取した。

【0019】この血清は、ウェスタンブロッティング法を用いて試験したところ、約1000の希釈でもC3G蛋白に対する確かな反応性を示したことから、C3G蛋白に対する抗体として使用可能であることが確認された。

#### 【0020】

【発明の効果】以上詳しく説明した通り、この発明によって、ras群遺伝子の活性化に伴う悪性腫瘍の新たな診断方法や治療法の開発が可能となる。

#### 【0021】

##### 【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 4062

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

生物名: ホモ サピエンス

細胞の種類: 脾臓細胞

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 123...3356

特徴を決定した方法: E

##### 配列

```

TTTTCTGGGC ACCGCTTCT GCTAGGGGT TGTAGTGAA AGTGCCTGCT CCCAGAGAAG 60
CTTGCTAAC CTAGCACAGT TTCTAAGCTA CCCAGGCTGC CAGACGAGC GAOCCTGCTG 120
CCATGGACAC AGACTCTCAG GGTCTCATC TCTCTCCTT CACCATGAAG CTGATGGACA 180
AATTCCACTC ACCCAAAATC AAGAGAACGC CATCAAGAA GGGAAAACCA GCTGAGGTGT 240
CCGTAAAGAT TCCAGAGAAG CCGTGTGAACA AAGAGGCAAC AGACAGATTT CTACCAGAGG 300
GCTACCTCTT CCCTTGGAT CTGGAGCAGC AGGCAGTAGA ATTTATGTCC ACCAGTGTG 360
TGGCTTCCAG GTCTCAAAGG CAGAAGAACC TGAGCTGGCT GGAGGAGAAA GAGAAGGAAG 420
TTGTCACTGC CCTGCGCTAC TTTAAGACCA TTGTGGACAA AATGGCAATT GATAAGAAGG 480
TACTGGAGAT GCTTCCAGGG TCAGCCAGCA AGGTGCTGGA GGCCATCTTA CCCTGGTGC 540
AGAACGATCC TCGAATTCTAG CACAGCTCAG CCCTCTCTTC CTGCTATAGC CGAGTGTACC 600

```

AAAGCCTCGC CAACCTCATT CGCTGGTCTG ACCAAGTGAT GCTGGAAGGC GTGAACTCAG 660  
AAGACAAGGA GATGGTGACG ACTGTGAAGG GGGTCATCAA GGCTGTGCTG GATGGAGTGA 720  
AGGAGCTGGT CAGGCTCACC ATCGAGAAGC AGGGACGTCC GTCTCCGACG AGCCCCGTGA 780  
AGCCCAGTTC CCCTGCCAGC AAGCCTGATG GCCCAGCAGA GCTCCCCCTG ACAGACCGCG 840  
AGGTAGAGAT CCTAAACAAG ACGACTGGGA TGTACAGTC AACTGAGCTC CTCCCAGATG 900  
CCACGGATGA AGAGGTGCGG CCCCCAAGC CTCTCTGACC TGGCATTGCG GTGGTTGATA 960  
ATAGTCCTCC ACCAGCATTG ACACCCAAGA AAAGACAGTC GGGCCCGTCC CCTACCCGAG 1020  
TGGCTGTGGT GGCCCCATG AGCCGAGCCA CCAGTGGCTC CAGTTTGCTT GTTGAATCA 1080  
ATAGGCAGGA TTTTGATGTT GACTGTTACG CACAGAGGCG ACTGTCAGGA GGCAGCCACT 1140  
CATATGGTGG AGAGTCGCCC CGCCTCTCCC CTTGCAGCAG CATAGACAAG CTCAGCAAGT 1200  
CAGACGAGCA GCTGTCTCTT CTGGACAGGG ACAGTGGGCA GTGCTCCCGG AACACAAGCT 1260  
GTGAAACACT AGACCACTAT GATCCCGACT ATGAATTCCT CCAGCAAGAC CTCTCTAACG 1320  
CAGACCAGAT ACCTCAGCAG ACGGCTGGA ACCTTAGCCC GTTGCCAGAG TCTTTGGGGG 1380  
AGTCTGGGTC TCCATTCTT GGCCCTCCTT TCCAGCTGCC TCTTGGCGGC CATCCCCAGC 1440  
CAGACGGACC TCTGGCCCCA GGGCAGCAGA CAGATACGCC ACCTGCTCTC CCGAGAAGA 1500  
AGCGCAGGAG CGCAGCCTCC CAGACGGCGG ACGGCTCTGG CTGCAGGGTG TCCTACGAGC 1560  
GGCATCCCTC GCAGTATGAC AACATCTCTG GGGAGGACCT GCAGAGCACA GCCCCGATCC 1620  
CATCGTCCC CTACGCGCCC TTGTCTGCTA TTCTGCCCTT TCAGCATGGA GGTTCCTCAG 1680  
CCCCTGTGCA ATTTGTGGT GATTTTACTG CTCTGAGTC AACCGGTGAC CCAGAAAAAC 1740  
CACCTCCTCT ACCAGAGAAG AAAACAAC ACATGCTGGC CTACATGCAG TTGCTGGAGG 1800  
ACTACTCGGA GCGCAGCCC TCTATGTTCT ACCAGACGCC ACAGAACGAG CACATCTACC 1860  
AGCAGAAGAA CAAGCTCCTC ATGGAGGTAT ACGGCTTCAG CCACTCCTTC AGTGGGGTGG 1920  
ACTCGTGCA GGAGCTGGCC CCGCGGCCCG CCCTACCCCC CAAGCAGCGG CAGCTGGAGC 1980  
CACCGGCTGG GAAAGACGGA CATCCAGAG ATCCTCAGC GGTACGCGG GTCCCTGGGA 2040  
AGGACAGCAG AGACGGCAGT GAGAGGGCCC CAAAGTCACC AGATGCTCTG GAGTCGGCTC 2100  
AGTOGGAGGA GGAAGTGAC GAGCTGTCCC TCATTGACCA CAACGAAATT ATGTCCAGGC 2160  
TGACGCTCAA GCAGGAGGGT GATGACGGCC CGGACGTCCG CGGAGGATCT GGGGACATCT 2220  
TACTGGTCCA TGCTACTGAG ACTGACAGGA AAGATTTGGT GTTGTACTGC GAGGCATTCC 2280  
TGACCACTA CAGGACCTTC ATCTCCCCAG AGGAGCTCAT CAAGAAGCTG CAGTACAGAT 2340  
ATGAGAAATT CTCTCCCTTT GCGACACAT TCAAGAAGCG CGTCAGCAAG AACACGTTCT 2400  
TCGTGCTGGT ACGGGTGGTG GATGAGCTCT GCCTGGTGA GTTGACAGAA GAGATCCTGA 2460  
AGCTGCTGAT GGAAGTGGT TTCCGCTGG TGTGCAATGG GGAGCTGAGC CTGGCCCCGTG 2520  
TGCTCCGAA GAACATCCTG GACAAGGTGG ACCAGAAGAA GCTACTCAGG TGTGCCACCT 2580  
CCAGCCAGCC CCTGGCAGCC CGGGGGGTAG CAGCCAGGCC GGGGACCTTG CACGACTTTC 2640  
ACAGCCATGA GATAGCGGAG CAGCTAACGC TGCTGGATGC TGAGCTCTTC TATAAATAG 2700  
AGATTCTGA GGTTTTGCTT TGGCAAAAG AGCAGAATGA GGAGAAGAGC CCAACTTGA 2760  
CCCAGTTAC GGAGCACTTC AACAACATGT CCTACTGGGT CCGGTCCATA ATCATGTTAC 2820  
AGGAAAAGGC CCAGGACAGG GAACGGCTGC TCTTGAAGTT CATCAAGATC ATGAAGCACT 2880  
TGGGAAGCT GAATACTTC AACTCCTACT TGGCCATCCT CTCTGCCCTG GACTCGGCGC 2940  
CCATCCGAG GCTGGAGTGG CAGAAGCAGA CTTAGAGGG OCTGGCCGAG TACTGCACAC 3000  
TGATCGACAG CTGCTCTCC TTCCGAGCCT ACCGGGCGGC CCTCTCGAG GTGGAACGCG 3060  
CGTGATCCC GTACCTGGGG CTGATCCTGC AGGACCTGAC CTTGTTTAC CTGGGAAACC 3120  
CAGACTACAT CGACGGGAAA GTGAATTCT CCAAGCGGTG GCAGCAGTTC AACATCCTCG 3180  
ACAGCATGCG CTGCTTCCAG CAGGCGCACT ATGACATGCG GAGGAACGAC GACATTATAA 3240  
ACTTCTTCAA TGACTTCAGT GACCACCTGG CTGAGGAGGC OCTATGGGAA CTGTCTCTGA 3300  
AAATTAACC CAGGAACATA ACAAGGAGAA AAACAGACCG GGAAGAGAAG ACCTAGGAGC 3360  
AGACGCGGG ATCCAGGAGA ATGCTCGAGG GGGCAGAGG GCAGCTCCA GACCGGAGAG 3420  
GACCTTGAC CTGTTAGGCG CATGGCAGGA GTCCCGGCT CCGAGCCATG AGGCTGGCCA 3480  
GCCCTCAGCG GGGCGGGCG GGAGCTGGAG CCTGCCAGCC GCTTCTGCTC TCCTTCTCT 3540  
GTGGGAGCAG ACCCGTGGGC CTCAGGGCAG CCAGCAGGCA GGTCTTGTG CCAATTATCA 3600

AACCGGTGGT TTTCTGGTIT GGTITITGTTT TCTGCTTTTA CTTCATCTC TCCCCTCTTG 3660  
 ACCTTCCACC CACTCCOCTC CAGGGAGAGA GCAGCAGAGA CTTCATCAGC AGACCAAGGA 3720  
 AGTGGTGGGT GCTCCOCTC CCTAAGCTCC AGGGTCOCTG AATCTTCTGA AATCTCAAAT 3780  
 GAGTGGAGGC CTCCTGGGGT GGCTGTCTCT GCAGGGGCC TGAATGGGG GCAAGCAGCT 3840  
 GGGTGGGCAG AATGCAGAGT AGACTCGGGG GAGGATCCTT TCACTTTCGG CTTCOCTTC 3900  
 TGATGCATGG AGGATGGTGT GAGCTTTTCA GCAGGCCCGG AAAGGTACGC AGGTGACGCC 3960  
 TTAGCAGCCC CGCAGCTGGT GCTCTGCCCC GCGGTACTGG CGCATCAGG GCCTOCTTG 4020  
 CCGCCTGAG AGCAGCAGCA GTCTCTGTCA TCCCGTGGCC CC 4062

配列番号: 2

起源

配列の長さ: 1077

生物名: ホモ サピエンス

配列の型: アミノ酸

細胞の種類: 脾臓細胞

配列の種類: タンパク質

配列

Met	Asp	Thr	Asp	Ser	Gln	Arg	Ser	His	Leu	Ser	Ser	Phe	Thr	Met
				5					10					15
Lys	Leu	Met	Asp	Lys	Phe	His	Ser	Pro	Lys	Ile	Lys	Arg	Thr	Pro
				20					25					30
Ser	Lys	Lys	Gly	Lys	Pro	Ala	Glu	Val	Ser	Val	Lys	Ile	Pro	Glu
				35					40					45
Lys	Pro	Val	Asn	Lys	Glu	Ala	Thr	Asp	Arg	Phe	Leu	Pro	Glu	Gly
				50					55					60
Tyr	Pro	Leu	Pro	Leu	Asp	Leu	Glu	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Phe	Met
				65					70					75
Ser	Thr	Ser	Ala	Val	Ala	Ser	Arg	Ser	Gln	Arg	Gln	Lys	Asn	Leu
				80					85					90
Ser	Trp	Leu	Glu	Glu	Lys	Glu	Lys	Glu	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Arg
				95					100					105
Tyr	Phe	Lys	Thr	Ile	Val	Asp	Lys	Met	Ala	Ile	Asp	Lys	Lys	Val
				110					115					120
Leu	Glu	Met	Leu	Pro	Gly	Ser	Ala	Ser	Lys	Val	Leu	Glu	Ala	Ile
				125					130					135
Leu	Pro	Leu	Val	Gln	Asn	Asp	Pro	Arg	Ile	Gln	His	Ser	Ser	Ala
				140					145					150
Leu	Ser	Ser	Cys	Tyr	Ser	Arg	Val	Tyr	Gln	Ser	Leu	Ala	Asn	Leu
				155					160					165
Ile	Arg	Trp	Ser	Asp	Gln	Val	Met	Leu	Glu	Gly	Val	Asn	Ser	Glu
				170					175					180
Asp	Lys	Glu	Met	Val	Thr	Thr	Val	Lys	Gly	Val	Ile	Lys	Ala	Val
				185					190					195
Leu	Asp	Gly	Val	Lys	Glu	Leu	Val	Arg	Leu	Thr	Ile	Glu	Lys	Gln
				200					205					210
Gly	Arg	Pro	Ser	Pro	Thr	Ser	Pro	Val	Lys	Pro	Ser	Ser	Pro	Ala
				215					220					225
Ser	Lys	Pro	Asp	Gly	Pro	Ala	Glu	Leu	Pro	Leu	Thr	Asp	Arg	Glu
				230					235					240
Val	Glu	Ile	Leu	Asn	Lys	Thr	Thr	Gly	Met	Ser	Gln	Ser	Thr	Glu
				245					250					255
Leu	Leu	Pro	Asp	Ala	Thr	Asp	Glu	Glu	Val	Ala	Pro	Pro	Lys	Pro
				260					265					270
Pro	Leu	Pro	Gly	Ile	Arg	Val	Val	Asp	Asn	Ser	Pro	Pro	Pro	Ala

275	280	285
Leu Thr Pro Lys Lys Arg Gln Ser Ala	Pro Ser Pro Thr Arg Val	
290	295	300
Ala Val Val Ala Pro Met Ser Arg Ala	Thr Ser Gly Ser Ser Leu	
305	310	315
Pro Val Gly Ile Asn Arg Gln Asp Phe	Asp Val Asp Cys Tyr Ala	
320	325	330
Gln Arg Arg Leu Ser Gly Gly Ser His	Ser Tyr Gly Gly Glu Ser	
335	340	345
Pro Arg Leu Ser Pro Cys Ser Ser Ile	Asp Lys Leu Ser Lys Ser	
350	355	360
Asp Glu Gln Leu Ser Ser Leu Asp Arg	Asp Ser Gly Gln Cys Ser	
365	370	375
Arg Asn Thr Ser Cys Glu Thr Leu Asp	His Tyr Asp Pro Asp Tyr	
380	385	390
Glu Phe Leu Gln Gln Asp Leu Ser Asn	Ala Asp Gln Ile Pro Gln	
395	400	405
Gln Thr Ala Trp Asn Leu Ser Pro Leu	Pro Glu Ser Leu Gly Glu	
410	415	420
Ser Gly Ser Pro Phe Leu Gly Pro Pro	Phe Gln Leu Pro Leu Gly	
425	430	435
Gly His Pro Gln Pro Asp Gly Pro Leu	Ala Pro Gly Gln Gln Thr	
440	445	450
Asp Thr Pro Pro Ala Leu Pro Glu Lys	Lys Arg Arg Ser Ala Ala	
455	460	465
Ser Gln Thr Ala Asp Gly Ser Gly Cys	Arg Val Ser Tyr Glu Arg	
470	475	480
His Pro Ser Gln Tyr Asp Asn Ile Ser	Gly Glu Asp Leu Gln Ser	
485	490	495
Thr Ala Pro Ile Pro Ser Val Pro Tyr	Ala Pro Phe Ala Ala Ile	
500	505	510
Leu Pro Phe Gln His Gly Gly Ser Ser	Ala Pro Val Glu Phe Val	
515	520	525
Gly Asp Phe Thr Ala Pro Glu Ser Thr	Gly Asp Pro Glu Lys Pro	
Pro Pro Leu Pro Glu Lys Lys Asn Lys	His Met Leu Ala Tyr Met	
545	550	555
Gln Leu Leu Glu Asp Tyr Ser Glu Pro	Gln Pro Ser Met Phe Tyr	
560	565	570
Gln Thr Pro Gln Asn Glu His Ile Ty	Gln Gln Lys Asn Lys Leu	
575	580	585
Leu Met Glu Val Tyr Gly Phe Ser Asp	Ser Phe Ser Gly Val Asp	
590	595	600
Ser Val Gln Glu Leu Ala Pro Pro Pro	Ala Leu Pro Pro Lys Gln	
605	610	615
Arg Gln Leu Glu Pro Pro Ala Gly Lys	Asp Gly His Pro Arg Asp	
620	625	630
Pro Ser Ala Val Ser Gly Val Pro Gly	Lys Asp Ser Arg Asp Gly	
635	640	645
Ser Glu Arg Ala Pro Lys Ser Pro Asp	Ala Leu Glu Ser Ala Gln	
650	655	660



Ser Glu Glu Glu Val Asp Glu Leu Ser Leu Ile Asp His Asn Glu	665	670	675
Ile Met Ser Arg Leu Thr Leu Lys Gln Glu Gly Asp Asp Gly Pro	680	685	690
Asp Val Arg Gly Gly Ser Gly Asp Ile Leu Leu Val His Ala Thr	695	700	705
Glu Thr Asp Arg Lys Asp Leu Val Leu Tyr Cys Glu Ala Phe Leu	710	715	720
Thr Thr Tyr Arg Thr Phe Ile Ser Pro Glu Glu Leu Ile Lys Lys	725	730	735
Leu Gln Tyr Arg Tyr Glu Lys Phe Ser Pro Phe Ala Asp Thr Phe	740	743	730
Lys Lys Arg Val Ser Lys Asn Thr Phe Phe Val Leu Val Arg Val	755	760	765
Val Asp Glu Leu Cys Leu Val Glu Leu Thr Glu Glu Ile Leu Lys	770	775	780
Leu Leu Met Glu Leu Val Phe Arg Leu Val Cys Asn Gly Glu Leu	785	790	795
Ser Leu Ala Arg Val Leu Arg Lys Asn Ile Leu Asp Lys Val Asp	800	805	810
Gln Lys Lys Leu Leu Arg Cys Ala Thr Ser Ser Gln Pro Leu Ala	815	820	825
Ala Arg Gly Val Ala Ala Arg Pro Gly Thr Leu His Asp Phe His	830	835	840
Ser His Glu Ile Ala Glu Gln Leu Thr Leu Leu Asp Ala Glu Leu	845	850	855
Phe Tyr Lys Ile Glu Ile Pro Glu Val Leu Leu Trp Ala Lys Glu	860	865	870
Gln Asn Glu Glu Lys Ser Pro Asn Leu Thr Gln Phe Thr Glu His	875	880	885
Phe Asn Asn Met Ser Tyr Trp Val Arg Ser Ile Ile Met Leu Gln	890	895	900
Glu Lys Ala Gln Asp Arg Glu Arg Leu Leu Leu Lys Phe Ile Lys	905	910	915
Ile Met Lys His Leu Arg Lys Leu Asn Asn Phe Asn Ser Tyr Leu	920	925	930
Ala Ile Leu Ser Ala Leu Asp Ser Ala Pro Ile Arg Arg Leu Glu	935	940	945
Trp Gln Lys Gln Thr Ser Glu Gly Leu Ala Glu Tyr Cys Thr Leu	950	955	960
Ile Asp Ser Ser Ser Ser Phe Arg Ala Tyr Arg Ala Ala Leu Ser			
Glu Val Glu Pro Pro Cys Ile Pro Tyr Leu Gly Leu Ile Leu Gln	980	985	990
Asp Leu Thr Phe Val His Leu Gly Asn Pro Asp Tyr Ile Asp Gly	995	1000	1005
Lys Val Asn Phe Ser Lys Arg Trp Gln Gln Phe Asn Ile Leu Asp	1010	1015	1020
Ser Met Arg Cys Phe Gln Gln Ala His Tyr Asp Met Arg Arg Asn	1025	1030	1035
Asp Asp Ile Ile Asn Phe Phe Asn Asp Phe Ser Asp His Leu Ala			

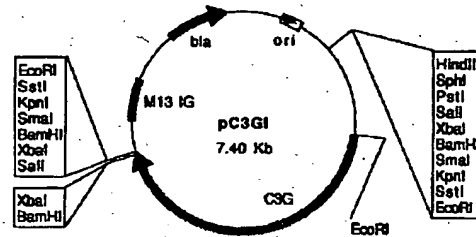
1040                      1045                      1050  
 Glu Glu Ala Leu Trp Glu Leu Ser Leu Lys Ile Lys Pro Arg Asn  
 1055                      1060                      1065  
 Ile Thr Arg Arg Lys Thr Asp Arg Glu Glu Lys Thr  
 1070                      1075

【図面の簡単な説明】

ある pC3G1 の構成図である。

【図1】 この発明のクローニングベクターの一実施例で

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

C 1 2 N 1/21

C 1 2 P 21/02

// A 6 1 K 38/00

G 0 1 N 33/53

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

7236-4B

C 9282-4B

ADU

D. 8310-2 J